



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS ARAÇATUBA

JAQUELINE SUEMI HASSUMI

Dimorfismo sexual relacionado às vias de reabsorção e formação de tecido ósseo de ratos e ratas castrados, após a exodontia do incisivo superior. Avaliação microtomográfica e por PCR em tempo real

Araçatuba

2018

JAQUELINE SUEMI HASSUMI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profª Associada Roberta Okamoto

Araçatuba

2018

Dedicatoria

Dedico a todos que estão nos
agradecimentos, pois se eu cheguei
aqui, foi porque todos me ajudaram.

Agradecimientos

A Deus...

Meu Senhor e meu Deus, muito obrigada pelas felicidades e dificuldades até aqui, agradeço por aquelas que estão por vir. Senhor, sempre meu pilar espiritual e mental, basta ficar em silêncio que nós encontramos as respostas certas. Quero que tudo aconteça no seu tempo. No tempo de Deus, tudo ocorre na mais perfeita graça e harmonia, temos que ser pacientes, o tempo "DELE" nunca é o tempo errado.

Aos meus amados pais...

Mítian Hassumí (Seu Zé) e Suely Hassumí (Dona Rosa) antes de tudo quero falar que eu os amo muito. Sou grata por tudo e por todas as coisas que vocês fizeram por nós, sei que deixaram de lado muitas vontades, para sempre fazer por mim e para meu irmão Eduardo, aquele menino chorão e bravo que também aprendi muito. Quero cuidar de vocês na velhice, com todo amor e carinho, retribuir e oferecer um pouco do que vocês fizeram e fazem. Como muitos dizem,

“pai e mãe deveriam ser para sempre”, amo muito vocês e quero sempre vocês ao meu lado até quando puder.

À profª Roberta Okamoto, minha orientadora e querida por todos nós...

Minha profunda admiração, uma mistura de elegância e inteligência. Com a senhora APRENDI a estudar, nos ensinou que estudar não é chato, é sempre instigante. Eu cresci muito cientificamente, fui, estou indo e quero ir muito mais onde nunca pensei que um dia eu chegaria. Professora muito obrigada pelas oportunidades por cada ensinamento e crescimento científico, quero q saiba que és um espelho, sempre procuramos a chegar pelos perto de toda a sua exuberante inteligência e elegância. NOSSA MÃE CIENTÍFICA, muito obrigada pelos ensinamentos e momentos de muita ríada e descontração.

À minha Banca Examinadora...

Formada por duas professoras muito querida por mim. Uma, a prof^a Ana Paula Bassi, tão pequenina e meiga que dá vontade de guarda num potinho. A senhora é a professora mãezona, sempre tem uma palavra doce e de conforto para nós na hora certa, aquela palavra que chega e faz carinho no coração. Mas, como todo mãezona, tem hora que precisa de pulso firme, aquela pequenina e meiga vira uma leoa, e nem por isso as palavras magoam e ferem, elas também são de amor e ensinamento. Muito obrigada, com a senhora aprendi muito, quero aprender muito mais e, vejo uma “pequena” semelhança entre nós, a braveza e o “dedinho”.

A outra prof^a é a Mariza Matsumoto, direto de Cotuba (by Matsumoto Family). Também tão pequenina e engraçada, com a senhora são altas risadas que deixam o corpo mais leve. O nosso departamento ganhou muito com a sua chegada, mais uma pesquisadora do “zol”, que com todo a sua delicadeza mexe com os camundonguinhos. Preciso

aprender com a senhora como ter a paciência nípônica e como faz para chegar em Cotuba. Professora e orientadora do meu Lândão, admiro muito a senhora, como todo o seu jeitinho leve e em meio de muitas risadas aprendo e quero aprender muito, e vamos colocar esse Lândão na linha da pesquisa científica.

Ao meu namorado, Danilo Masocatto, Lândão para muitos e Tesouro só para mim...

Sabe aquela pessoa que sempre pedi a Deus?!?! É você. Sou muito grata por isso. São 8 anos ao seu lado eu quero muito os outros 8 x 8 x 8 com você. Minha alma gêmea e meu oposto ao mesmo tempo, você é o leite e eu o café, você a calma e eu a agitação, você o quietinho e eu a falante, muito falante. Somos os opostos com muito amor, não falo que a gente se completa, porque para oferecer algo, temos que estar cheios e transbordando e no nosso caso é o amor. Tenho tanto amor que não cabe no peito e que sorte a minha eu encontrei você, enviado por Deus para mim. Te

amo meu Tesouro (Lindão). Não posso esquecer-me de citar, que junto com você ganhei mais uma família Seu Otávio, Dona Marisa, o Mú, a Tamí e a gostosura do Benício. Vou deixar aqui bem claro, vái se preparando que logo terá pedido de casamento e muitos bacurís.

Aos meus amigos do nosso laboratório...

“Essa família é muito unida, e também muito ouriçada, brigam por qualquer razão, mas acabam pedindo perdão”. A música perfeita, que descreve nós do Laboratório para Estudos de Tecidos Mineralizados. Com certeza somos uma família, e aprendemos muito mais juntos, e é juntos que nos divertimos, brincamos, brigamos, nos desculpamos, mas o que importa é que no final tudo fica bem. Muito obrigada minha família científica (ICs: Naara, Isa, Ana Cláudia, Letícia, Paulinha, Jaque, Ana Carol, Taty, Flávia, Jú Moura, Lauriene / Pós: Fábio, Gabriel, Pedro, Breno e Paulo) e, também sou grata por aquelas pessoas que por

algum motivo tiveram que ir, mas não são menos importantes do que aquelas que estão presente.

Aos meus amigos do famoso departamento

ANATO & HISTO

Sabe aquele lugar que você ama ir?!? É esse departamento, cheio de pessoas agradáveis, departamento leve, alegre, contagiante. Todos gostariam de fazer parte deste departamento, mas são poucos que tem esse privilégio. Lá eu tenho amigos muito especiais, como o Luan (Lulís) que briga comigo e não consegue ficar de mal por muito tempo, logo vem e me chama de Jacaroa, em meio a muita risada sempre trocamos conhecimentos. Também, tem o Gestter (Ché), tenho certeza que ficará famoso, ganhará o prêmio Nobel de como fazer nascer cabelo em carecas. Junto vem a Isa, que se bandeou para o IBB, mas voltou. Também tem: o Luy, as Jéssicas, o Vinícius, Mari, Maria Clara, José,

Ana Cláudia, Carol, André (Azeite), o Dudu, Elísa, Raquel, Claudinha, Ramez, Gustavinho e o apêndice, Jadison.

Aos Professores, que de alguma forma
também são especiais...

Ao Teacher Paul, o ícone e lendário professor de anatomia, muito obrigada pelos ensinamentos e o almoço sem a sua companhia é triste. Teacher ED (Ervolino) o professor mais didático que corrobora com os ensinamentos na histologia. Professor Américo muito obrigada, pelos ensinamentos e pelo "miaí" meu com a prof^a Roberta. Professora Alaíde, Casatti e Roelf, professores fundamentais para minha formação.

Lá no departamento de cirurgia, o famoso 10A, tem o professor Francys, só tem a cara de durão, mas no fundo é todo brincalhão e suas aulas são de muitos conhecimentos de histórias com cirurgia. A professora Dani, gaúcha, toda quietinha, voz mansinha e com muito conhecimento para

transmitir. A professora Alessandra toda energética, que faz e nos ensina muito sobre o CADE. O professor Léo, pessoa que presenciei o processo de transformação de pós para professor da FOA/UNESP. Muito merecido, sempre batalhou e conseguiu, fonte de inspiração e conhecimento.

Não dá para falar um por um de cada professor, mas quero deixar bem claro, todos foram essenciais para a minha formação. Só tenho que agradecer pelas oportunidades que tive aqui, nesta instituição, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA/UNESP. Muito grata por todo o conhecimento adquirido e por todas as oportunidades ofertadas.

À Turma VX

Turma diferente, com diversidade de pessoas, com várias panelinhas, mas não vivemos na "Faixa de Gaza". Agradeço por todos os anos de convivência, e agradeço de forma especial aos meus amigos do grupo "Elite da

FOA/Roles dos Manos". A Liachan que está dividindo esse momento comigo de TCC, a "parça das parças". A Roberta Bochechuda e Rançosa de todos os tempos e minha dupla do último ano inteiro, muito obrigada pelo companheirismo. O Diego Tetudo, que topa qualquer role se for comida e o culpado por alguns quilos a mais durante a graduação. E não posso esquecer as duas jarianes de Birigui, Cíntia e Gleice. Elas parecem quietinhas, mas no fundo só abrem a boca para falar verdades. Tenho certeza que vou levar a amizade de vocês comigo, de forma presente ou abstrata do coração, muito obrigada por todos os anos de amizade.

Aos que contribuem Para o funcionamento da FOA

Aos vigilantes, muito obrigada pela recepção na entrada e despedida para o meu retorno à minha casa, enquanto vocês zelam pela faculdade.

Obrigada pelas clínicas e dependências limpas, tenho certeza que vocês, tias e meninos da limpeza são essenciais.

Obrigada aos técnicos e servidores e pessoal do STAEPE, vocês ajudam muito no andamento das aulas, clínicas, departamentos e laboratórios.

Ao pessoal da CDMAC, esterilização e triagem, muito obrigada, se pudesse levava vocês como meu auxiliares na clínica. Sentirei saudades.

À Dora da cantina, muito obrigada pela comida gostosa de todos os dias, para quem não mora com a mãe, você é a mãezona para muitos na FOA/UNESP.

Ao Reitor, Diretor e Vice

Muito obrigada, em época de crise conseguiram a agradar a todos, não deixou faltar e exagerar nem de um lado nem de outro.

Às instituições de apoio financeiro à pesquisa

Muito obrigada a PROPe - Pró-Reitoria de Pesquisa - UNESP (Edital 004/2013), PIBIC - Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (118491/2014-8 e 128205/2015-6) e FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2015/25599-8) pelo investimento à pesquisa do Brasil.

Epígrafe

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”

Provérbios 16:3

RESUMO

HASSUMI, J. S. **Dimorfismo sexual relacionado às vias de reabsorção e formação do tecido ósseo de ratos e ratas castrados, após a exodontia do incisivo superior. Avaliação microtomografica e por PCR em tempo real.** 2018. 81f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

A osteoporose é uma doença sistêmica, multifatorial, progressiva, caracterizada pela redução da massa óssea, deterioração e modificação da micro e macroarquitetura do tecido ósseo. Por muito tempo foi considerada uma doença da mulher (♀), porém, atualmente está sendo reconhecida como uma doença do homem (♂). Assim, o objetivo deste estudo foi observar como se comportam as vias de reabsorção e formação óssea em animais que apresentam predisposição para a osteoporose, tanto do gênero masculino (♂) como feminino (♀). Para isso, foram utilizados 30 ratos machos (♂) e 30 ratas fêmeas (♀) divididos em grupos: SHAM (♀/♂) e castrados, que foram ♂ orquiectomizados (ORQ) e ♀ ovariectomizadas (OVX). Deste modo, após 30 dias da castração, foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e subdivididos de acordo com o tempo de eutanásia, 14 e 42 dias pós exodontia e os métodos de análises do alvéolo em reparação, Reação de Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real e microtomografia computadorizada (micro-ct). Os dados quantitativos foram submetidos a teste de Shapiro Wilk, Anova e pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Nas análises de expressões gênicas, observou-se que durante o processo de reparo alveolar, após 14 dias da exodontia, em OVX houve um aumento significativo na expressão dos genes que codificam a fosfatase alcalina (ALP) e a osteocalcina (OC) e, em ORQ houve pico de expressão do gene para ALP e do receptor ativador do fator nuclear kappa-β ligante (RANKL). No entanto, aos 42 dias, para osteoprotegerina (OPG) e RANKL, em OVX e ORQ, houve baixa expressão de OPG e alta de RANKL. A partir das análises de micro-ct dos alvéolos em reparação aos 42 dias de todos os grupos, em OVX parece diminuir a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), aumentar a separação entre as trabéculas (TB.SP) e a porcentagem da porosidade óssea total (PO.TOT). Em ORQ observou-se diminuição do volume ósseo (BV), da espessura das trabéculas (TB.TH) e da separação entre elas. Assim, dentro dos limites do presente estudo, concluiu-se que a ausência dos esteroides gonadais parece prejudicar a expressão

gênica de proteínas da matriz extracelular, interferindo na qualidade do tecido ósseo, principalmente nos períodos tardios. E, em ambos os sexos, a expressão de RANKL está aumentada e de OPG diminuída, o que indica maior atividade osteoclástica tanto aos 14 como aos 42 dias. Além disso, através da micro-ct observou-se que a ausência dos esteroides gonadais, também prejudica a quantidade e qualidade óssea e de forma mais acentuada nas ♀.

Palavras chave: Osteoporose. Dimorfismo sexual. Expressão gênica. Alvéolo do dente. Microtomografia computadorizada.

Abstract

HASSUMI, J. S. **Sexual dimorphism related with the resorption and formation pathways the bone tissue of the castrated rats after extraction of upper incisor. Analysis microcomputerized tomography and real time PCR.** 2018, 81p. End of Course Paper (Bachelor Degree) – Araçatuba School of Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The osteoporosis is a systemic, multifactorial and progressive disease. It is typified decrease, deterioration and modification of macro and microarchitecture of bone tissue. A long time, it was considered a woman illness, however, it is being recognized as a man illness. Thus, the objective of this study was to observe how the resorption and formation pathways behave in the animals with predisposition to osteoporosis, both male and female. For this purpose, 30 male rats and 30 female rats were used and divided into groups: SHAM (♀/♂) and castrated, that they were orchiectomized ♂ (ORQ) and ovariectomized ♀ (OVX). In this way, after 30 days of the castration, the animals were submitted to extraction of right upper incisor and divided in according with the euthanasia time, that it was 14 and 42 days after the extraction surgery and analysis method of the alveolus in repair, real time Polymerase Chain Reaction (PCR) and microcomputerized tomography (micro-ct). The quantitative data were submitted to Shapiro Wilk test, Anova test and Tukey post-test with 5% of significance level. In the gene expression analysis, it was observed that the alveolar repair process after 14 days of extraction surgery, in OVX showed a significant increase of gene expression coding for alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC). In ORQ, results showed a peak of gene expression for ALP and receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand (RANKL). However, after 42 days of extraction surgery, OVX and ORQ showed a decrease in gene expression for osteoprotegerin and RANKL. For micro-ct analysis of alveolus repair after 42 days extraction surgery, OVX showed low percentage of bone volume and the largest separation between bone trabecular and right percentage of bone porosity. The ORQ group showed decrease bone volume, trabecular bone thickness and separation between trabecular bone. Thus, within the limits this study, it was concluded that gonadal steroids appear to be prejudicial for gene expression of extracellular matrix protein and it affect the quality of bone tissue, especially in the late ones. In both

sexes, the RANKL expression is increase and OPG expression decrease, that it indicates higher osteoclastic activity in the 14 as at 42 days after extraction surgery. Furthermore, the micro-ct showed that gonadal steroids appear also injures the quality and amount of bone tissue, it is more severely in women.

Keywords: Osteoporosis. Sexual dimorphism. Gene expression. Teeth alveolus. Microcomputerized tomography.

Lísta de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais	60
Quadro 2 – Distribuição dos grupos após a exodontia do incisivo superior direito, conforme o tempo de eutanásia e o método de avaliação do alvéolo em reparação	62
Quadro 3 – Valores dos parâmetros considerados padrões de acordo com as guidelines da JBMR dos grupos de ratas SHAM e castradas (OVX)	68
Quadro 4 – Valores dos parâmetros considerados padrões de acordo com as guidelines da JBMR dos grupos de ratos SHAM e castrados (ORQ)	70

Lísta de Fíguas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Coleta da secreção vaginal para análise microscópica do ciclo estral das ratas	60
Figura 2 – Imagens representativas da cirurgia de ovariectomia mostrando a tricotomia (a), local da incisão (b), exposição do ovário (c), ligadura (d), remoção do ovário (e), sutura final (f)	60
Figura 3 – Imagens representativas da cirurgia de orquiectomia mostrando o escroto (a), antissepsia com álcool iodado (b), incisão (c), exteriorização do testículo (d), ligadura (e), remoção do testículo (f), testículos removidos (g), sutura final (h)	61
Figura 4 – Imagens representativas da cirurgia de exodontia mostrando os incisivos (a), antissepsia com álcool iodado (b), sindesmotomia (c), luxação do incisivo superior direito (d), remoção do incisivo superior direito (e), incisivo superior direito removido (f)	61
Figura 5 – Imagens representativas da extração de RNA total mostrando o congelamento da amostra com nitrogênio líquido (a), reagente Trizol (b), kit de purificação para a obtenção do RNA total (c), verificação da integridade do RNA total (d), kit para confecção do cDNA (e)	62
Figura 6 – Imagens representativas da avaliação da expressão gênica mostrando Taqman Gene Expression Master Mix (a), placa de 96 well (b), Step One Plus (c), curva de desnaturação padrão das amostras	63
Figura 7 – Imagens representativas dos softwares e do equipamento utilizado para realização das microtomografias computadorizadas (a), imagem microtomográfica do alvéolo em reparação (b), software Nrecon (c), Dataviewer (d), Ctan (e), Ctvox (f)	63

Lísta de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores da expressão relativa para ALP, OC, OPG e RANKL dos grupos SHAM ♀ e OVX (14 e 42 dias)	64
Tabela 2 - Valores da expressão relativa para ALP, OC, OPG e RANKL dos grupos SHAM ♂ e ORQ (14 e 42 dias)	66

Lísta de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – É importante observar que a deficiências de estrógeno em ratas aos 42 dias (OVX 42d) houve maior expressão de RANKL e menor para OPG, sendo que o grupo SHAM aos 42d apresenta maiores valores para OPG e OC e menor valor para RANKL. Os níveis de expressão para OC continuaram aumentados em OVX 42d	65
Gráfico 2 – Os ratos com deficiência de testosterona (ORQ) apresentam pico de expressão de ALP, menor expressão de OPG e maior de RANKL aos 14 dias e 42 dias	67
Gráficos 3 e 4 – O grupo OVX apresenta menor volume ósseo e maior porosidade óssea total	69
Gráfico 5 – A deficiência de estrógeno (OVX) fez com que os espaços entre as trabéculas aumentassem	69
Gráfico 6 – Com a deficiência testosterona observou a redução do volume ósseo em ratos (ORQ)	71
Gráfico 7 – Com a deficiência de testosterona observou menor espessura do osso trabecular (ORQ)	71
Gráfico 8 – No grupo ORQ observou menor separação entre as trabéculas	72
Gráfico 9 – Ratio de RANKL/OPG com valores maior que 1 indica atividade reabsortiva	72

Lísta de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor
μ	Micro
μm	Micrômetro
♀	Mulher/fêmea/feminino
♂	Homem/macho/masculino
°C	Graus Celsius
ALP	Fosfatase alcalina
bit	Binary digit (binário)
BV	Volume ósseo
BV/TV	Porcentagem de volume ósseo
Ca ⁺²	Cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
D	Dia
DMO	Densidade mineral ósseo
E ₂	Estrógeno
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
FOAr	Faculdade de Odontologia de Araraquara
g	Gramas
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
Kg	Kilograma
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
MICRO-CT	Microtomografia computadorizada
ml	Mililitros

mm	Milímetro
OC	Osteocalcina
ORQ	Orquiectomizados
OVX	Ovariectomizadas
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
PO.TOT	Porosidade óssea total
Prof ^a	Professora
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa- β
RANKL	Receptor ativador de fator nuclear kappa- β ligante
RNA	Ácido ribonucleico
TB.TH	Espessura do osso trabecular
TB.N	Número de trabéculas
TB.SP	Separação entre as trabéculas
UNESP	Universidade Estadual Paulista

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	38
2 OBJETIVO	42
3 METODOLOGIA	44
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
3.1.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
3.1.2 CICLO ESTRAL	45
3.1.3 ANESTESIA	46
3.1.4 CASTRAÇÃO	46
3.1.4.1 OVARIECTOMIA	46
3.1.4.2 ORQUIECTOMIA	46
3.1.5 EXTRAÇÃO DENTAL	47
3.1.6 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	47
3.2 PROCESSAMENTOS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS	47
3.2.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS	47
3.2.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	48
3.2.3 ADEQUAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O ESCANEAMENTO TRIDIMENSIONAL	48
3.2.4 AVALIAÇÃO TRIDIMENSIONAL	49
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	49
4 RESULTADOS	50
4.1 EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA	51
4.1.1 FÊMEAS	51
4.1.1.1 ALP	51
4.1.1.2 OC	51
4.1.1.3 OPG	51
4.1.1.4 RANKL	51
4.1.2 MACHOS	52
4.1.2.1 ALP	52

4.1.2.2 OC	52
4.1.2.3 OPG	52
4.1.2.4 RANKL	52
4.2 MICRO-CT	52
4.2.1 FÊMEAS	53
4.2.2 MACHOS	53
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	57
QUADROS, FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	59
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	79
ANEXO A - Certificado da Comissão de Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	80
ANEXO B - Certificado da Comissão de Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	81

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O esqueleto realiza diversas funções importantes em nosso organismo, proporcionando mobilidade, apoio, proteção, atuando como um reservatório de íons de cálcio (Ca^{+2}) e fósforo e, também sendo importante na ancoragem dos dentes nos maxilares.^{12,13,21} O tecido ósseo não é estático e para que desempenhe suas funções de forma saudável, a matriz extracelular (MEC) é continuamente depositada por osteoblasto e absorvido por osteoclastos ativos, um processo coordenado e normal de remodelação óssea. Sobre a MEC, ocorre a precipitação de Ca^{+2} e fosfato, permitindo que o osso se forme.^{8,13,28}

Este processo ocorre através da modulação do sistema receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK)/RANKL/OPG, considerado peça-chave na regulação do metabolismo ósseo. O RANKL é expresso por osteoblastos e seus precursores imaturos, enquanto que seu receptor RANK é expresso por osteoclastos e seus precursores. Quando há ligação entre eles, ocorre ativação dos osteoclastos e inicia-se o processo de reabsorção óssea. A OPG é produzida por osteoblastos e células estromais da medula óssea que quando se liga a RANKL, limita a interação entre RANKL e RANK, inibindo a sinalização para formação osteoclástica e reabsorção óssea. A homeostase óssea é alcançada quando este sistema atua de forma adequada, resultando num equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.^{31,34} Quando há algum fator que possa desorganizar a atividade osteoblástica e osteoclástica, a qualidade do tecido esquelético pode ser severamente comprometida, resultando no desenvolvimento de uma condição patológica.^{8,28}

Sendo assim, a osteoporose é uma doença sistêmica do esqueleto, multifatorial e progressiva, caracterizada pela redução da massa óssea, deterioração e modificação da micro e macroarquitetura do tecido ósseo. Tanto o osso cortical como o esponjoso são afetados, aumentando o risco de fratura óssea. Dessa forma, a capacidade do osso resistir a forças mecânicas e fraturas, não depende apenas da quantidade, mas também, da qualidade do tecido ósseo.^{11,32}

A osteoporose pode ser primária ou secundária. A forma primária é de causas naturais e é classificada em tipo I e tipo II.^{8,32} No tipo I, ou pós-menopausa, existe rápida perda óssea em mulheres (♀) recentemente menopausadas. Já, a tipo II, ou senil, está relacionada ao envelhecimento, por deficiência crônica de Ca^{+2} ,

aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea, ocorrendo em ambos os sexos.^{8,23} A osteoporose secundária, quando não há uma causa primária, é decorrente de processos inflamatórios, alterações endócrinas, deficiência de vitamina D e, por uso de drogas como heparina, corticoides, álcool, anticonvulsivantes e vitamina A. Quando as causas são desconhecidas, é denominada de osteoporose idiopática.^{8,23,32}

Nas ♀, durante a menopausa ocorre deficiência de estrógeno (E_2), levando ao desenvolvimento da osteoporose pós-menopausa.²³ Isto ocorre devido ao fato de que, em baixas concentrações, o E_2 modula negativamente o remodelamento ósseo, causando um aumento na reabsorção óssea osteoclástica. Este processo é decorrente do aumento da concentração plasmática de interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral que estimulam a produção de IL-6 e fator estimulador de colônias de macrófago.^{19,25} Essa cascata favorece a ligação entre RANKL e RANK, ativando a osteoclastogênese e a reabsorção óssea.²⁹ Alguns estudos relatam que a deficiência de E_2 interfere no reparo alveolar de ratas ovx após a extração de elemento dentário quando comparadas às ratas que não foram submetidas à castração,^{16,18} evidenciando que o déficit de E_2 pode prejudicar a neoformação óssea nos maxilares após criação de ferida cirúrgica.^{27,33}

No homem (♂), como a testosterona persiste em níveis funcionais até aos 70 anos de idade, pensava-se na inexistência da osteoporose masculina. Por muito tempo, a osteoporose foi considerada uma doença da ♀, porém, atualmente, também está sendo reconhecida como uma questão de saúde pública para o ♂.²³ Ao contrário do que acontece com as ♀ pós-menopausa, a redução da neoformação óssea está relacionada à idade nos ♂, combinado a dieta e níveis hormonais deficientes tornando os agentes anabólicos uma opção de tratamento lógica para ♂ com osteoporose.⁷ A queda de absorção de Ca^{+2} no intestino e alta prevalência de insuficiência de vitamina D em ♂ idosos contribuem para o elevado nível sérico de hormônio da paratireoide e perda óssea.¹⁵ No ♂, a testosterona e o E_2 são importantes para o ganho e manutenção da massa óssea,²³ mas, os níveis livres ou biodisponível de testosterona e E_2 diminuem com a idade, devido ao aumento do nível sérico da globulina ligadora de hormônios sexuais e falha de compensação do eixo hipotálamo/hipófise/testículo.²⁴

Os hormônios sexuais são responsáveis pela maturação e dimorfismo sexual do esqueleto. As meninas por terem puberdade precoce, aos 12 anos e, os meninos tardia, aos 14 anos de idade, o sexo masculino alcança altura e massa óssea maior.²³ Por isso, a osteoporose evolui mais lentamente nos ♂ do que nas ♀.^{11,23,32} Tanto ♂ como ♀ perdem quantidade similar de tecido ósseo trabecular durante o envelhecimento. Porém, no ♂ predomina o afinamento das trabéculas e, na ♀ a perda da conectividade, pois, a deficiência de E₂ resulta em perda óssea acelerada.²³

De acordo com a Fundação Internacional de Osteoporose,⁶ o tratamento da doença é prioridade para a saúde pública. A doença chega a afetar um terço das ♀ com mais de 50 anos com riscos iminentes de sofrer algum tipo de fratura, além da associação com doenças cardiovasculares. E um em cada oito ♂ acima dos 50 anos terá uma fratura relacionada à osteoporose.⁵ E este quadro tem perspectiva de aumentar com o envelhecimento da população masculina.² O conhecimento sobre as vias envolvidas no estabelecimento destas condições em ♂ e ♀ precisam ser mais bem investigadas.

O processo de reparo alveolar é um modelo experimental bastante estudado, que permite avaliar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente.^{4,22} Na condição de deficiência de E₂ ou osteoporose, estudos do nosso grupo mostram que há um retardo na cronologia do processo de reparo alveolar, bem como uma diminuição na imunomarcagem da osteocalcina (OC), importante marcador das respostas de mineralização do tecido ósseo. Além disso, estudos mostram que com relação ao sistema OPG, RANK e RANKL, há uma redução de OPG e aumento de RANKL frente a essa interferência sistêmica.^{15,17,18} Uma questão importante a ser respondida, consiste nas respostas sobre como produzir um tecido mineralizado de boa qualidade para suportar as forças mecânicas decorrentes de uma reabilitação com prótese sobre implante, em condições de comprometimento de osso e, outra é se o comportamento das proteínas e fatores de transcrição que comandam o metabolismo do tecido ósseo é o mesmo nos ♂ e nas ♀.³⁵

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi observar o comportamento das vias de reabsorção e formação óssea em animais que apresentam predisposição para a osteoporose, tanto do gênero masculino como feminino. Para isso, foram utilizadas análises quantitativas, tais como: PCR em tempo real, que avaliou a expressão relativa dos genes OC, ALP, OPG e RANKL; micro-ct, na qual foram utilizadas as guidelines de Buxsein (2010), que avaliaram parâmetros como porcentagem de volume ósseo (BV/TV), número (TB.N), espessura (TB.TH) e separação entre as trabéculas (TB.SP), volume ósseo (BV) e porcentagem de porosidade total óssea (PO.TOT).

Metodología

3 METODOLOGIA

Após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA: 00685-2015 e 00706-2015) para o estudo foram utilizados um total de 30 ratos ♂ e 30 ♀ (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos e com peso corporal de aproximadamente 350g. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas, ambiente com temperatura estável ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) e água ad libitum.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os grupos experimentais foram: ratos e ratas sham, animais que passaram por cirurgias fictícias de castração, na qual não há a remoção das gônadas, somente a exposição das mesmas, para que todos os animais tenham o mesmo “estresse cirúrgico” e; os grupos castrados de ♂ e ♀, que são denominados de ORQ e OVX respectivamente (QUADRO1). Nos grupos citados anteriormente, ocorreu a remoção propriamente dita das glândulas sexuais, para ocorrer a interrupção da produção dos hormônios sexuais, com a finalidade dos animais adquirirem a condição de osteopenia.²⁷

3.1.2 CICLO ESTRAL

Para garantir que as ratas utilizadas nos experimentos estivessem ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata¹⁴ para reconhecimento das fases do ciclo estral,^{19,20} após de 2 a 3 ciclos regulares, as ratas foram utilizadas para o experimento (FIGURA1).

3.1.3 ANESTESIA

Para todos os procedimentos cirúrgicos (castração, exodontia do incisivo superior direito e eutanásia), todos os animais foram devidamente anestesiados com 70 mg/Kg de cloridrato de cetamina (VETASET® 100 mg/ml, FORT DODGE, Campinas/SP, Brasil) e 30 mg/Kg de cloridrato de xilazina (COOPAZINE® 20 mg/ml, COOPERS, Cotia/SP, Brasil) por injeção intramuscular (IM).

3.1.4 CASTRAÇÃO

3.1.4.1 OVARIECTOMIA

Para a remoção dos ovários bilateralmente, as ratas foram anestesiadas e posicionadas em decúbito lateral, após tricotomia e antissepsia com álcool iodado. A incisão foi realizada lateralmente à linha mediana e à meia distância entre a última costela e o joelho. O ovário é envolto por uma massa de tecido adiposo e após a sua evidenciação, ligadura e remoção, foi realizada sutura com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (FIGURA 2).

3.1.4.2 ORQUIECTOMIA

Após a anestesia, os ratos foram imobilizados sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal, após a antissepsia com álcool iodado. Foi realizada a incisão mediana anterior no escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, os funículos espermáticos foram ligados com fio de Nylon 5.0 (Ethicon – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) e seccionados. Os testículos e os epidídimos foram removidos e o escroto suturado com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (FIGURA 3).

3.1.5 EXTRAÇÃO DENTAL

Após 30 dias da cirurgia de castração, os animais foram anestesiados, foi realizada a antissepsia com álcool iodado do campo operatório, a exodontia do incisivo superior direito foi executada com instrumental cirúrgico especialmente adaptado para este fim,¹ e suturada a mucosa gengival com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0 – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) (FIGURA 4). Os grupos foram subdivididos em grupos de 14 e 42 dias (Sham ♂/♀ - ORQ - OVX) pós exodontia para a eutanásia e avaliação do alvéolo em reparação, através da PCR em tempo real e da micro-ct (quadro 2).

3.1.6 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Após 14 dias da cirurgia de exodontia, 5 animais de cada grupo foram anestesiados para curetagem do alvéolo em reparação da maxila direita para análise de PCR em tempo real. Cada fragmento ósseo, representado pelo alvéolo em reparação foi cuidadosamente lavado com solução de cloreto de sódio 0,9% gelada, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para posteriormente realizar a extração do RNA total da amostra.

Após 42 dias da cirurgia de exodontia, o restante dos animais de cada grupo foram anestesiados, 5 foram destinados para análise de PCR em tempo real utilizando os procedimentos citados acima e, os outros 5 animais de cada grupo foram destinados para análise de micro-ct. A maxila direita de cada animal foi removida e colocada em solução de formalina a 10%.

Todos os animais do experimento foram eutanasiados com dose letal de anestésico.

3.2 PROCESSAMENTOS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS

3.2.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS AMOSTRAS

A técnica de PCR em tempo real foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão gênica de marcadores relacionados ao processo de reparo ósseo: ALP e

OC estão relacionados com a mineralização, OPG com a inibição da osteoclastogênese e regulação da população de osteoclastos ativos; e RANKL com a ativação da osteoclastogênese. A extração do RNA total das amostras foi realizada com o reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o Kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após a análise da integridade, pureza, concentração e normalização do RNA total, foi confeccionado o cDNA utilizando 1µg de RNA através da reação de transcriptase reversa com o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) (FIGURA 5).

3.2.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Os cDNAs foram pipetados juntamente com o Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e as sondas para a detecção de ALP, OC, OPG e RANKL na placa de PCR CFX96 well (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate) em duplicata de cada amostra. A PCR em tempo real foi realizado no sistema Step One Plus (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pela curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à expressão das proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos ósseos dos alvéolos em reparação dos diferentes períodos experimentais (método $\Delta\Delta CT$) (FIGURA 6).

3.2.3 ADEQUAÇÃO DAS AMOSTA PARA O ESCANEAMENTO 3D

As maxilas direitas com o alvéolo em reparação foram fixadas em solução de formalina a 10% de 48 horas, lavadas por 24 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de

feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOAr/UNESP).

3.2.4 AVALIAÇÃO TRIDIMENSIONAL

As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional. (ROI). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza²⁸ (FIGURA 7).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e aplicado o teste de Shapiro-Wilk, ANOVA e o pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4 Resultados

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA

O grupo SHAM (♂/♀) 14 dias é o controle e por isso que os valores de expressões dos gene para ALP, OC, OPG e RANKL é próximo de 1. Assim, os valores dos demais grupos são relacionados a ele, mostrando quantas vezes mais ocorreu a expressão do determinado gene (TABELA E GRÁFICO 1 E 2).

4.1.1 FÊMEAS

4.1.1.1 ALP

No grupo OVX observou pico de expressão aos 14 dias, o contrário ocorreu aos 42 dias ($p < 0,05$).

4.1.1.2 OC

No grupo OVX observou pico de expressão aos 14 dias, e continuou aumentada aos 42 dias ($p < 0,05$).

4.1.1.3 OPG

No grupo OVX 42 dias observou menor expressão ($p < 0,05$).

4.1.1.4 RANKL

O grupo OVX tanto aos 14 como aos 42 dias apresentou maior expressão, o contrário ocorreu em SHAM 42 dias ($p < 0,05$).

4.1.2 MACHOS

4.1.2.1 ALP

Em todos os grupos, ORQ 14 dias, SHAM 42 dias e ORQ 42 dias observou valores de expressões maiores que 1 ($p<0,05$).

4.1.2.2 OC

Todos apresentaram valores de expressão menos que o grupo SHAM 14 dias. ($p<0,05$)

4.1.2.3 OPG

ORQ aos 14 e 42 dias mostraram menores valores de expressão ($p<0,05$).

4.1.2.4 RANKL

O grupo ORQ 42 dias apresentou maior expressão ($p<0,05$).

4.2 MICRO-CT

As análises morfométricas, a partir dos alvéolos em reparação aos 42 dias de todos os animais, foram avaliados os parâmetros considerados padrão, BV, BV/TV, TB.TH, TB.N, TB.SP e PO.TOT, de acordo com as Guidelines da JBMR (Bouxsein e cols., 2010).

4.2.1 FÊMEAS

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas comparações entre SHAM x OVX para os parâmetros BV/TV, TB.SP e PO.TOT (QUADRO 3, TABELA 4,5).

4.2.2 MACHOS

As diferenças ($p < 0,05$) encontradas entre SHAM x ORQ foram para os parâmetros BV. TB.TH e TB.SP. (QUADRO 4, TABELA 6,7,8).

DÍSCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Já se sabe que a qualidade do tecido ósseo é crucial para o sucesso das reabilitações orais.^{9,10} Tem sido sugerido que a densidade mineral óssea (DMO), o volume ósseo e o osso trabecular são parâmetros fundamentais na taxa de sobrevivência dos implantes.^{26,30} A micro-ct apresenta-se como padrão-ouro para avaliar esses parâmetros ósseos, porém ainda não é aplicada na clínica.³

Com os parâmetros tridimensionais avaliados pela micro-CT no alvéolo após 42 dias da exodontia do incisivo superior direito, é importante destacar, que após a ovariectomia, a porosidade mostrou aumento significativo e, a fração de volume ósseo, bastante relacionado com o osso trabecular, apresentou valor reduzido. Dessa forma, observou menor número de trabéculas ósseas e com consequente aumento na separação entre as elas.

Já nos machos, é de grande importância destacar que valores encontrados nos parâmetros avaliados, mostraram padrão de comportamento diferente do observado nas ♀. O volume ósseo e a espessura das trabéculas apresentaram valores menores após a orquiectomia. No entanto, quando foi avaliada a fração de volume ósseo, não foram notadas diferenças significativas. Um parâmetro que mostrou comportamento inverso ao observado nas ♀ foi a separação entre as trabéculas ósseas, pois após a cirurgia de castração, este parâmetro mostrou-se reduzido.

Os hormônios sexuais são responsáveis pela maturação e dimorfismo sexual. Nas mulheres a puberdade é mais precoce, por volta dos 12 anos de idade. Já, nos homens, é mais tardia, em torno dos 14 anos de idade, por isso, maior estatura e massa óssea, fazendo com que a osteoporose masculina evolua lentamente.^{11,23,32}

Sendo assim, homens e mulheres perdem quantidade similar de osso trabecular durante o envelhecimento. Nos homens ocorre o afinamento das trabéculas ósseas e, nas mulheres com osteoporose ocorre a perda da conectividade entre a trabéculas, o que caracteriza a perda óssea acelerada.²³ Estas informações corroboram como os dados do presente estudo, pois, na micro-ct, o

ORQ apresentou redução significativa da espessura do osso trabecular e, as OVX apresentaram valores significativos de maior porcentagem de porosidade óssea total e menor porcentagem de volume ósseo

Também, neste estudo foi observada a expressão de genes relacionados à mineralização do tecido ósseo, que são a ALP e OC e, a reabsorção óssea, OPG e RANKL. Nos grupos castrados, tanto nos ♂ como nas ♀, durante o processo de reparo alveolar, os genes relacionados a mineralização óssea teve pico aos 14 dias. Aos 42 dias, a OC continuou aumentada em OVX e, a ALP em ORQ, na tentativa de estimular uma resposta reparacional para a precipitação dos minerais do tecido ósseo. Porém, ao observar as expressões dos genes OPG e RANKL, relacionados à reabsorção óssea, ambos demonstraram valores favoráveis para a ativação da osteoclastogênese, com expressão de RANKL maior que a OPG nos períodos de avaliação, 14 e 42 dias após exodontia (GRÁFICO 9).

Isso pode ser uma indicação de que a ausência dos esteroides gonadais realmente alteram o metabolismo ósseo, fazendo com que mesmo esses animais não tenham a idade avançada, quando os hormônios sexuais são inibidos aumenta a predisposição a osteoporose. Dado importante, pois muitas mulheres antes da menopausa precisam realizar cirurgias de ooforectomia, e mesmo com a idade jovem há risco de desenvolver a osteoporose e a necessidade de tratamento medicamentoso. Assim, aspecto a ser avaliado nos próximos estudos do nosso grupo consiste na caracterização do dimorfismo sexual quanto a resposta do osso comprometido, tratado com diferentes fármacos disponíveis comercialmente e que possuem ações anti-reabsortivas ou até mesmo anabólicas sobre o tecido ósseo. Frente ao dimorfismo sexual observado na ausência dos esteroides gonadais observado no presente estudo, espera-se que o comportamento frente a diferentes fármacos também possua um padrão dimórfico sexual.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Assim, dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a ausência dos esteroides gonadais, prejudicam a qualidade e quantidade óssea de forma mais acentuada nas ♀. Em ambos os sexos, aumenta a atividade osteoclástica aos 14 dias e principalmente aos 42 dias, através da expressão gênica aumentada de RANKL e diminuída de OPG e, prejudica a expressão de proteínas da matriz extracelular nos períodos tardios.

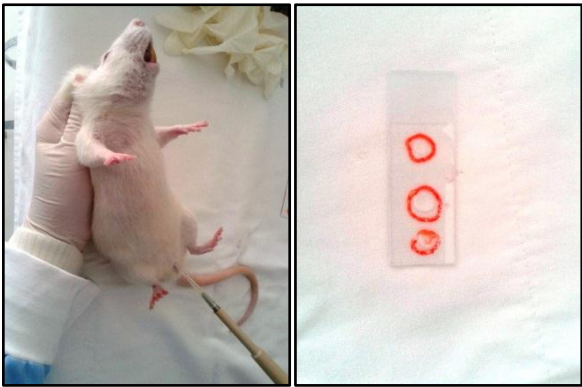
Quadros, Figuras,
Tabelas &
Gráficos

QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

GRUPOS GÊNERO	SHAM	OVX	ORQ
♀	15	15	-
♂	15	-	15

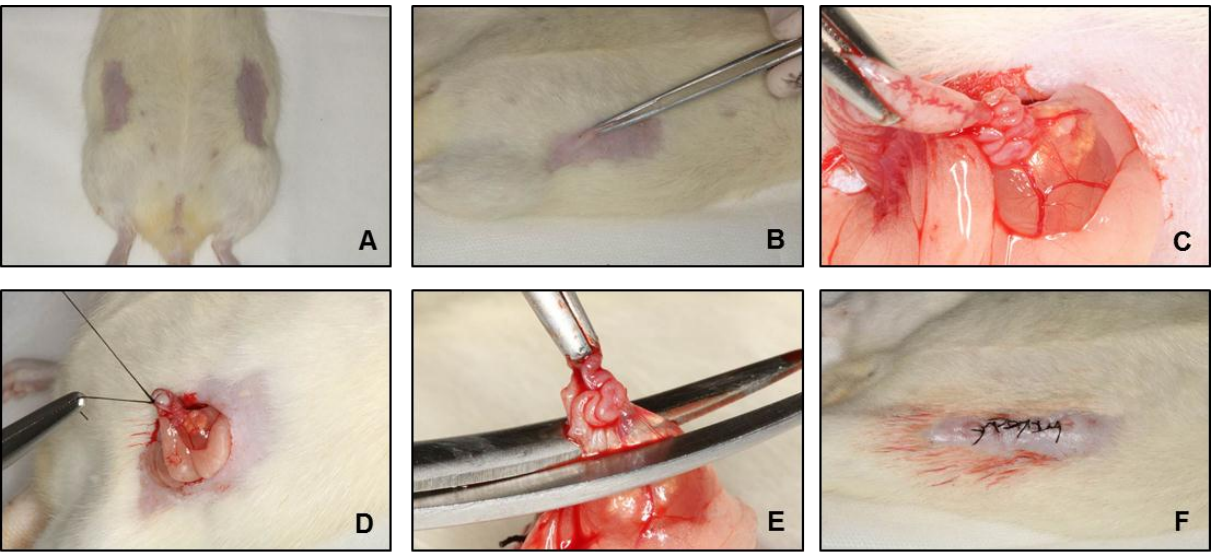
Fonte: Elaborado pela Autora

FIGURA 1 – COLETA DA SECREÇÃO VAGINAL PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA DO CICLO ESTRAL DAS RATAS



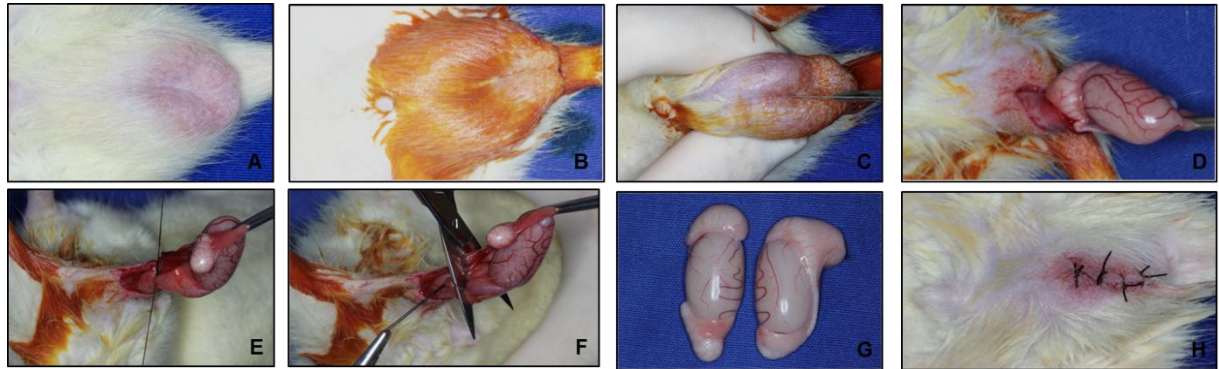
Fonte: Elaborada pela Autora

FIGURA 2 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DA CIRURGIA DE OVARECTOMIA MOSTRANDO A TRICOTOMIA (A), LOCAL DA INCISÃO (B), EXPOSIÇÃO DO OVÁRIO (C), LIGADURA (D), REMOÇÃO DO OVÁRIO (E), SUTURA FINAL (F)



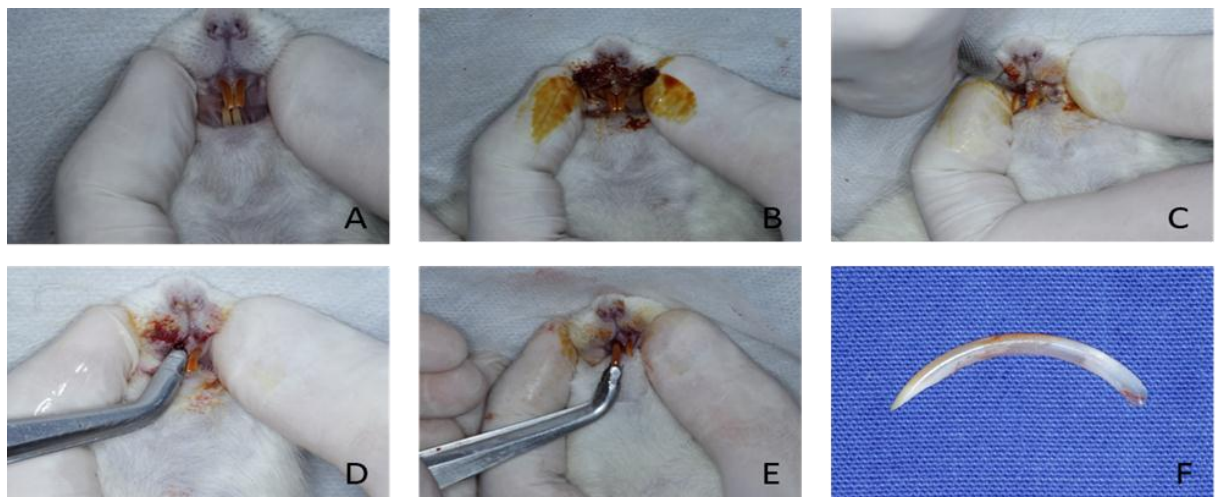
Fonte: Elaborada pela Autora

FIGURA 3 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DA CIRURGIA DE ORQUIECTOMIA MOSTRANDO O ESCROTO (A), ANTISSEPSIA COM ÁLCOOL IODADO (B), INCISÃO (C), EXTERIORIZAÇÃO DO TESTÍCULO (D), LIGADURA (E), REMOÇÃO DO TESTÍCULO (F), TESTÍCULOS REMOVIDOS (G), SUTURA FINAL (H)



Fonte: Elaborada pela Autora

FIGURA 4 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DA CIRURGIA DE EXODONTIA MOSTRANDO OS INCISIVOS (A), ANTISSEPSIA COM ÁLCOOL IODADO (B), SINDESMOTOMIA (C), LUXAÇÃO DO INCISIVO SUPERIOR DIREITO (D), REMOÇÃO DO INCISIVO SUPERIOR DIREITO (E), INCISIVO SUPERIOR DIREITO REMOVIDO (F)



Fonte: Elaborada pela Autora

QUADRO 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS APÓS A EXODONTIA DO INCISIVO SUPERIOR DIREITO, CONFORME O TEMPO DE EUTANÁSIA E O MÉTODO DE AVALIAÇÃO DO ALVÉOLO EM REPARAÇÃO

Grupo	Eutanásia (dias após a exodontia)		Procedimentos para avaliação (Micro-ct e PCR-rt)		
	14 dias	42 dias	14 dias	42 dias	
			PCR-rt	Micro-ct	PCR-rt
Sham ♂	5	10	5	5	5
ORQ	5	10	5	5	5
SHAM ♀	5	10	5	5	5
OVX	5	10	5	5	5

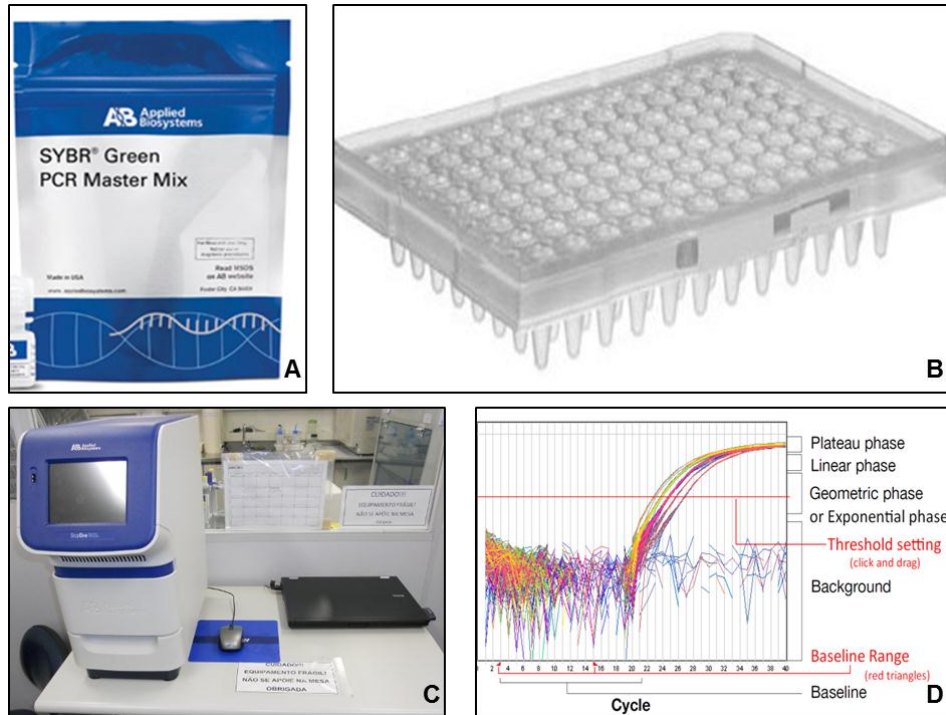
Fonte: Elaborado pela Autora

FIGURA 5 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DA EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL MOSTRANDO O CONGELAMENTO DA AMOSTRA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO (A), REAGENTE TRIZOL (B), KIT DE PURIFICAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO RNA TOTAL (C), VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL (D), KIT PARA CONFEÇÃO DO CDNA (E)



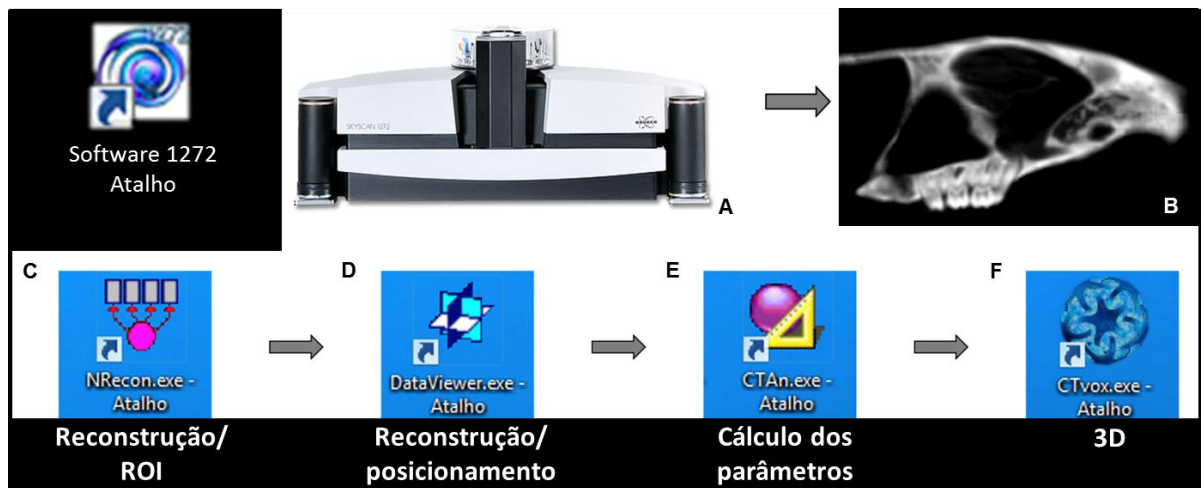
Fonte: Elaboração pela Autora

FIGURA 6 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA MOSTRANDO TAQMAN GENE EXPRESSION MASTER MIX (A), PLACA DE 96 WELL (B), STEP ONE PLUS (C), CURVA DE DESNATURAÇÃO PADRÃO DAS AMOSTRAS (D)



Fonte: Elaborada pela Autora

FIGURA 7 – IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS SOFTWARES E DO EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA REALIZAÇÃO DAS MICROTOMOGRAFIAS COMPUTADORIZADAS (A), IMAGEM MICROTOMOGRÁFICA DO ALVÉOLO EM REPARAÇÃO (B), SOFTWARE NRECON (C), DATAVIEWER (D), CTAN (E), CTVOX (F)



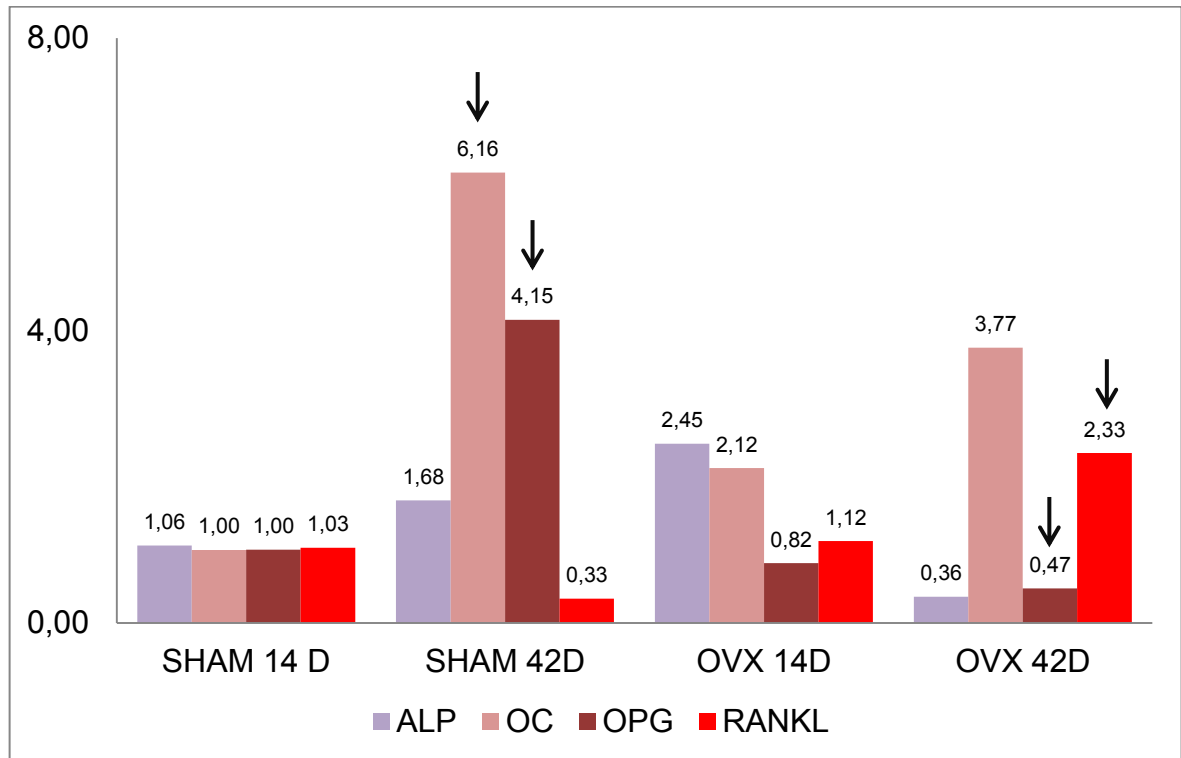
Fonte: Elaborada pela Autora

TABELA 1 – VALORES DA EXPRESSÃO RELATIVA PARA ALP, OC, OPG E RANKL DOS GRUPOS SHAM ♀ E OVX (14 E 42 DIAS)

GRUPO	VALOR DA EXPRESSÃO
ALP	
SHAM 14 DIAS	1,06
OVX 14 DIAS	2,45
SHAM 42 DIAS	1,68
OVX 42 DIAS	0,36
OC	
SHAM 14 DIAS	1,00
OVX 14 DIAS	2,12
SHAM 42 DIAS	6,16
OVX 42 DIAS	3,77
OPG	
SHAM 14 DIAS	1,00
OVX 14 DIAS	0,82
SHAM 42 DIAS	4,15
OVX 42 DIAS	0,47
RANKL	
SHAM 14 DIAS	1,03
OVX 14 DIAS	1,12
SHAM 42 DIAS	0,33
OVX 42 DIAS	2,33

Fonte: Elaborada pela Autora

GRÁFICO 1 – É IMPORTANTE OBSERVAR QUE A DEFICIÊNCIAS DE ESTRÓGENO EM RATAS AOS 42 DIAS (OVX 42D) HOUVE MAIOR EXPRESSÃO DE RANKL E MENOR PARA OPG, SENDO QUE O GRUPO SHAM AOS 42D APRESENTA MAIORES VALORES PARA OPG E OC E MENOR VALOR PARA RANKL. OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PARA OC CONTINUARAM AUMENTADOS EM OVX 42D



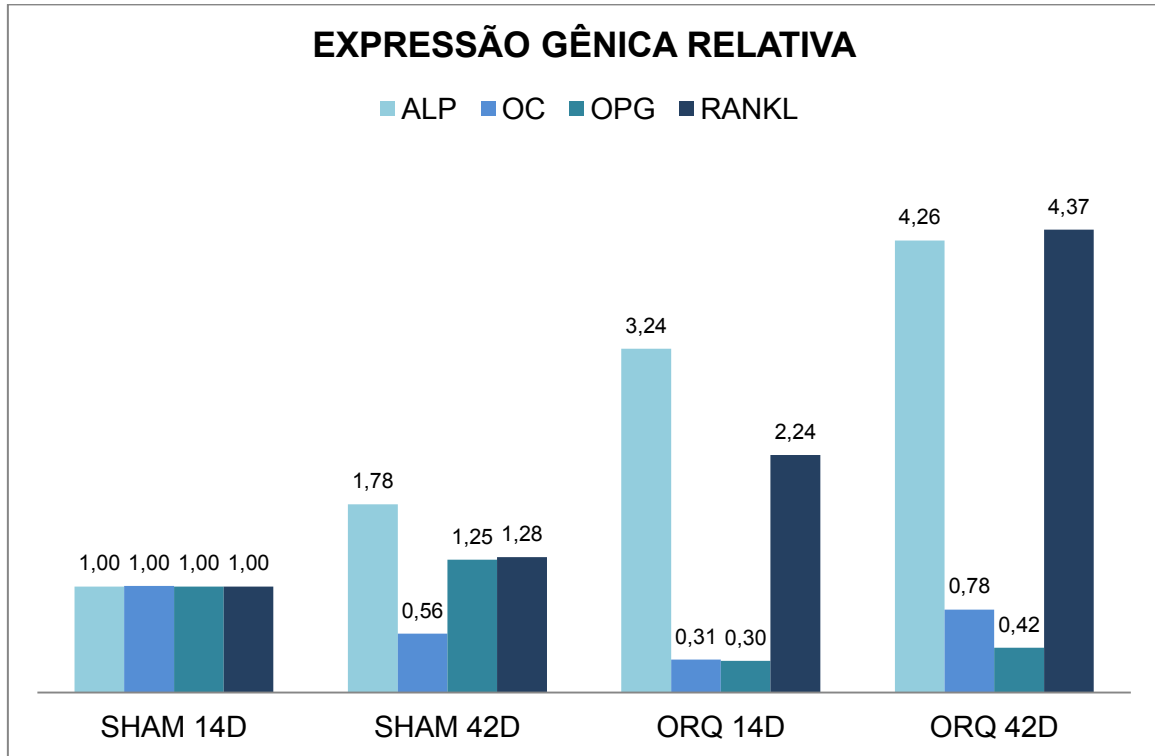
Fonte: Elaborado pela Autora

TABELA 2 - VALORES DA EXPRESSÃO RELATIVA PARA ALP, OC, OPG E RANKL DOS GRUPOS SHAM ♂ E ORQ (14 E 42 DIAS)

GRUPO	VALOR DA EXPRESSÃO
ALP	
SHAM 14 DIAS	1,00
ORQ 14 DIAS	3,24
SHAM 42 DIAS	1,78
ORQ 42 DIAS	4,26
OC	
SHAM 14 DIAS	1,00
ORQ 14 DIAS	0,31
SHAM 42 DIAS	0,56
ORQ 42 DIAS	0,78
OPG	
SHAM 14 DIAS	1,00
ORQ 14 DIAS	0,30
SHAM 42 DIAS	1,25
ORQ 42 DIAS	0,42
RANKL	
SHAM 14 DIAS	1,00
ORQ 14 DIAS	2,24
SHAM 42 DIAS	1,28
ORQ 42 DIAS	4,37

Fonte: Elaborada pela Autora

GRÁFICO 2 – OS RATOS COM DEFICIÊNCIA DE TESTOSTERONA (ORQ) APRESENTAM PICO DE EXPRESSÃO DE ALP, MENOR EXPRESSÃO DE OPG E MAIOR DE RANKL AOS 14 DIAS E 42 DIAS



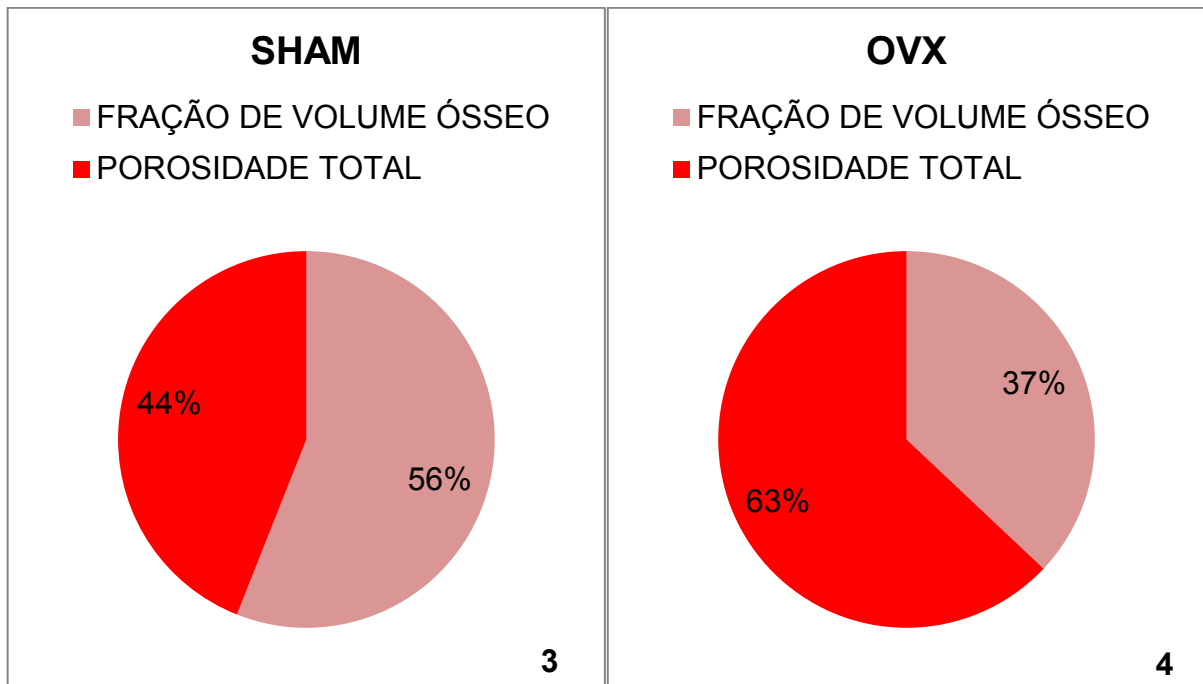
Fonte: Elaborado pela Autora

QUADRO 3 – VALORES DOS PARÂMETROS CONSIDERADOS PADRÕES DE ACORDO COM AS GUIDELINES DA JBMR DOS GRUPOS DE RATAS SHAM E CASTRADAS (OVX)

GRUPOS PARÂMETROS	SHAM	OVX
Bv (mm ³)	45,83	46,47
Bv/Tv (%)	56,01	37,03*
Tb.Th (mm)	1,16	1,07
Tb.N (1/mm)	0,47	0,34
Tb.Sp (mm)	0,93	1,45*
Po (to) (%)	43,98	62,93*

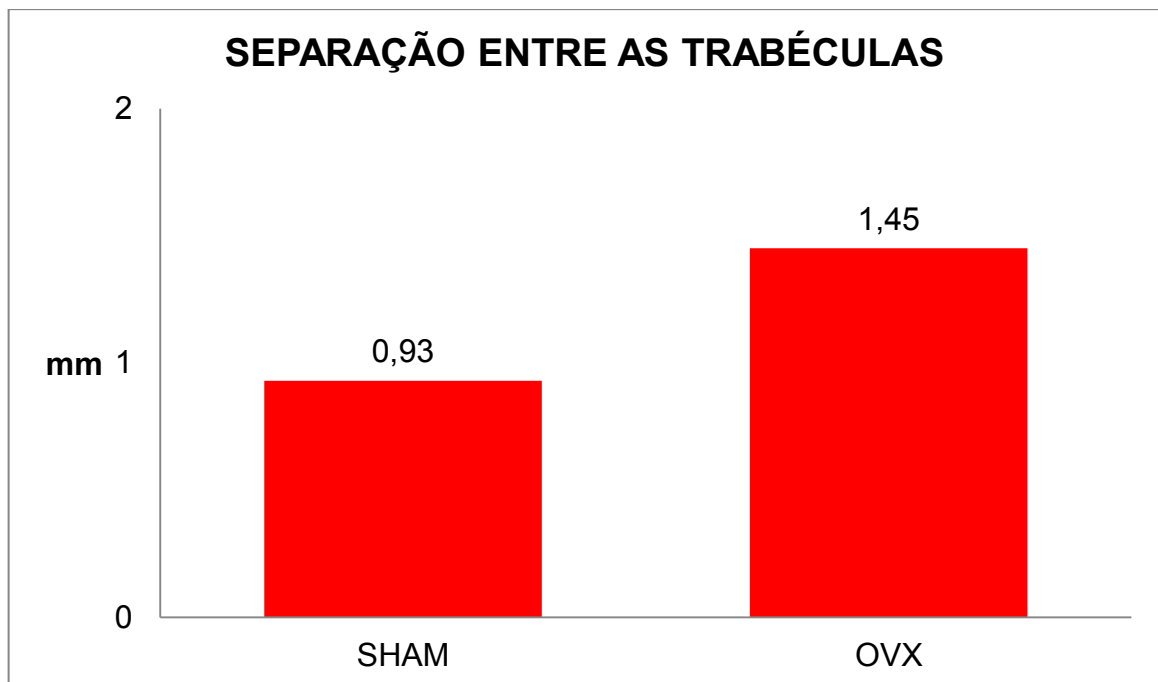
Fonte: Elaborada pela Autora

GRÁFICOS 3 E 4 – O GRUPO OVX APRESENTA MENOR VOLUME ÓSSEO E MAIOR POROSIDADE ÓSSEA TOTAL



Fonte: Elaborado pela Autora

GRÁFICO 5 – A DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO FEZ COM QUE OS ESPAÇOS ENTRE AS TRABÉCULAS AUMENTASSEM



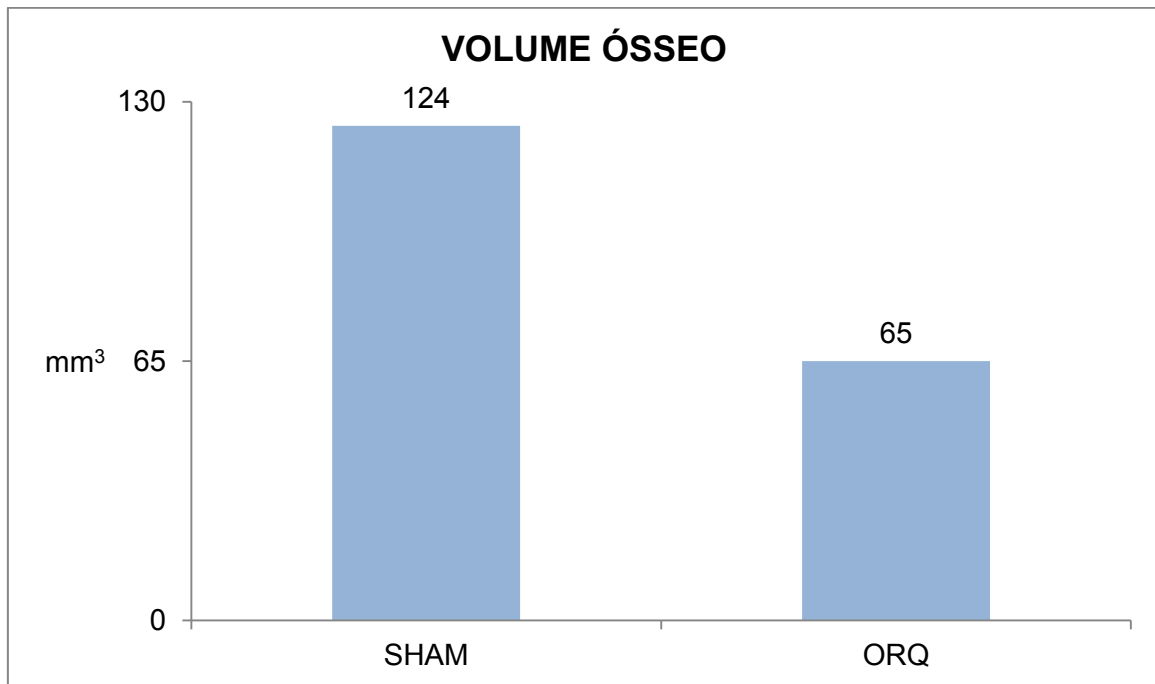
Fonte: Elaborado pela Autora

QUADRO 4 – VALORES DOS PARÂMETROS CONSIDERADOS PADRÕES DE ACORDO COM AS GUIDELINES DA JBMR DOS GRUPOS DE RATOS SHAM E CASTRADOS (ORQ)

GRUPOS PARÂMETROS	SHAM	ORQ
Bv (mm ³)	124	65*
Bv/Tv (%)	60,35	59,69
Tb.Th (mm)	1,50	1,21*
Tb.N (1/mm)	0,43	0,50
Tb.Sp (mm)	1,05	0,76*
Po (to) (%)	39	40,31

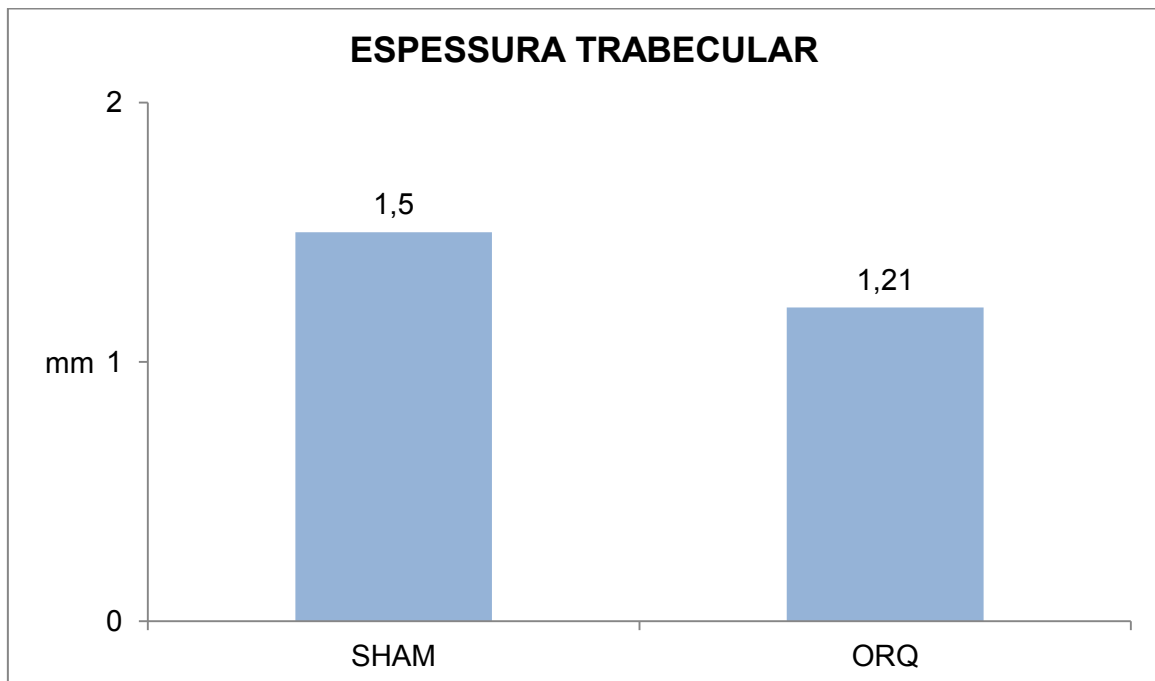
Fonte: Elaborado pela autora

GRÁFICO 6 – COM A DEFICIÊNCIA TESTOSTERONA OBSERVOU A REDUÇÃO DO VOLUME ÓSSEO EM RATOS (ORQ)



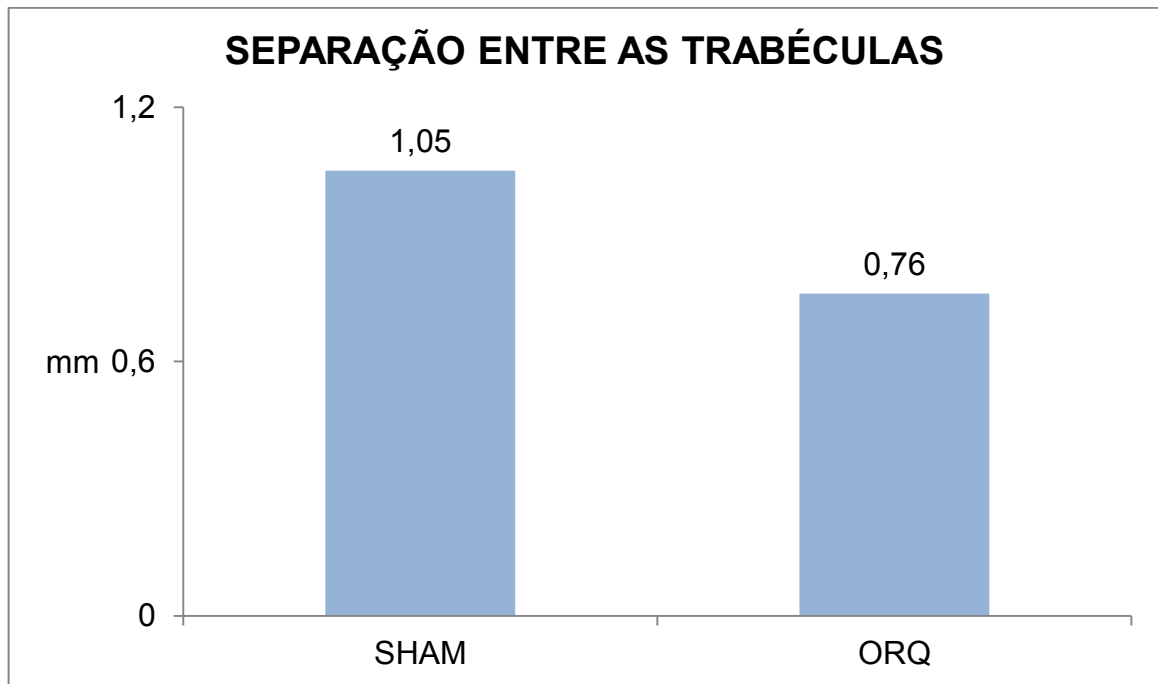
Fonte: Elaborado pela Autora

GRÁFICO 7 – COM A DEFICIÊNCIA DE TESTOSTERONA OBSERVOU MENOR ESPESSURA DO OSSO TRABECULAR



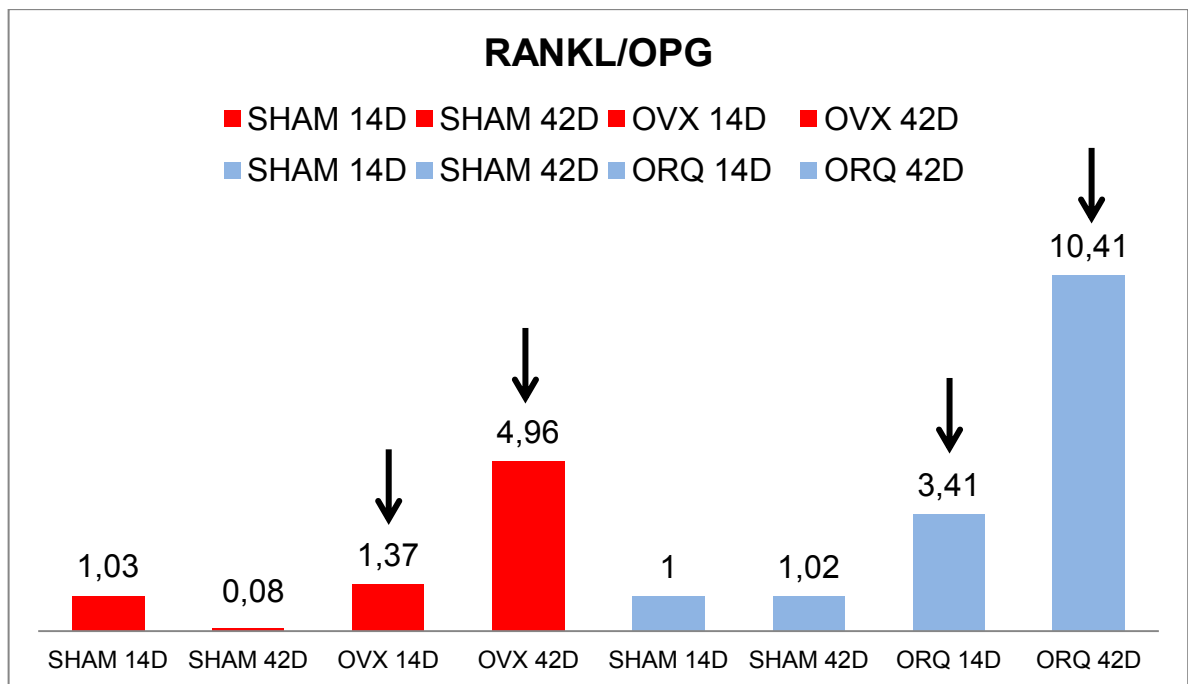
Fonte: Elaborado pela Autora

GRÁFICO 8 – NO GRUPO ORQ OBSERVOU MENOR SEPARAÇÃO ENTRE AS TRABÉCULAS



Fonte: Elaborado pelo autor

GRÁFICO 9 – RATIO DE RANKL/OPG COM VALORES MAIOR QUE 1 INDICA ATIVIDADE REABSORTIVA



FONTE: Elaborado pela Autora

Referências

REFERÊNCIAS

1. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, et al. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res.* 2009;24(1):153-61.
2. Burge, R.; Dawson-Hughes, B.; Solomon, D.H.; Wong, J.B.; King, A.; Tosteson, A. Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of bone and mineral research.* 2007; 2(3):465-75.
3. Burghardt, A.J., Link, T.M., Majumdar, S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. [Clin. Orthop. Relat. Res.](#) 2011; 469(8):2179-93.
4. Carvalho, A.C.P.; Okamoto, T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. 1nd ed. São Paulo (BR): Panamericana, 1987.
5. Cooper, C.; Melton III, L.J. Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab.* 1992; 3:224-29.
6. Foundation IO. Facts and statistics about osteoporosis and its implications 2009. Available from: www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html.
7. Gagnon, C.; Li, V.; Ebeling, P.R. Osteoporosis in men: its pathophysiology and the role of teriparatide in its treatment. *Clinical interventions in aging.* 2008; 3(4):635-45.
8. Gali, J.C. Osteoporose. *Acta Ortop Bras.* 2001; 9(2):3-12.

9. Jaffin, R.A.; Berman, C.L. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. *J Periodontol.* 1991; 62(1):2-4.
10. Jemt, T.; Lindén, B.; Lekholm, U. Failures and complications in 127 consecutively paced fixed partial prostheses supported by Branemark implants: from prosthetic treatment to first annual checkup. *Int J Oral Maxillofac Implants.* Spring. 1992; 7(1):40-4.
11. Khosla, S.; Amin, S.; Orwoll, E. Osteoporosis in Men. *Endocrine Reviews.* 2008; 29(4):441–64.
12. Kyrgidis A, Toulis K. Denosumab-related osteonecrosis of the jaws. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):369-70.
13. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, et al. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res.* 2007;22(12):1832-41.
14. Long, J.A. & Evans, H.M. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California.* 1922; 6: 1-148.
15. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010;46(4):1021-9.
16. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):984-90. PubMed PMID: 21536255. Epub 2011/05/04. eng.
17. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG

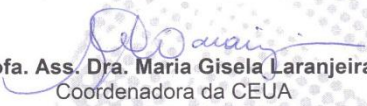
- during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):52-9.
18. Marcondes F, Bianchi F, Tanno A. Determinação das fases do ciclo estral em ratas: considerações úteis. *Brazilian Journal of Biology.* 2002;62(4a):609-14.
 19. Miller PD, Bolognese MA, Lewiecki EM, McClung MR, Ding B, Austin M, et al. Effect of denosumab on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass after long-term continued, discontinued, and restarting of therapy: a randomized blinded phase 2 clinical trial. *Bone.* 2008;43(2):222-9.
 20. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta.* 2005;360(1):81-6.
 21. Okamoto T, de Russo M. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973;2(2):153.
 22. Oliveira, L.G.; Guimarães, M.L.R. Osteoporose no homem. *Rev Bras Ortop.* 2010; 45(5):392-6.
 23. Otto S, Baumann S, Ehrenfeld M, Pautke C. Successful surgical management of osteonecrosis of the jaw due to RANK-ligand inhibitor treatment using fluorescence guided bone resection. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2013;41(7):694-8.
 24. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1989;86(7):2398-402.
 25. Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C, Brandi ML, Brown JP, Czerwiński E, et al. Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal

- osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res.* 2012;27(3):694-701.
26. Parfitt, A.M.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. [J Bone Miner Res.](#) 1987;2(6):595-610.
 27. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics.* 2015;20(3).
 28. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res.* 1998;13(5):763-73.
 29. Ringe, J.D.; Faber, H.; Farahmand, P.; Dorst, A. Efficacy of risedronate in men with primary and secondary osteoporosis: results of a 1-year study. *Rheumatol Int.* 2006; 26(5):427-31.
 30. Shapurian, T.; Damoulis, P.D.; Reiser, G.M.; Grinffin, T.J.; Rand, W.M. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. [Int J Oral Maxillofac Implants.](#) 200;21(2):290-7.
 31. Souza, M.P.G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Ortop.* 2010; 45(3):220-9.
 32. Stopeck AT, Lipton A, Body J-J, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, et al. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol.* 2010;28(35):5132-9.

33. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;142:155-70.
34. Von Wowern, N.; Kollerup, G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J. Prosthet. Dent*. 1992; 67:656–60.
35. Zacchetti G, Dayer R, Rizzoli R, Ammann P. Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. *BioMed research international*. 2014;2014.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - Ratos

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" CAMPUS ARAÇATUBA FACULDADE DE ODONTOLOGIA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA	
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals		
CERTIFICADO		
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise histométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratos orquiectomizados submetidos à terapia com teriparatida" , Processo FOA nº 00706-2015, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Junho de 2017.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Julho de 2017.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Alveolar repair process. Histometric and immunohistochemical analysis in orchidectomized rats treated with teriparatide" , Protocol FOA nº 00706-2015, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 15, 2017.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 15, 2017.		
 Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira Coordenadora da CEUA CEUA Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		

ANEXO B - Certificado da Comissão de Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - Ratas



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



**CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação do processo de reparo alveolar de ratas com deficiência de estrógeno tratadas com denosumab ou ranelato de estrôncio. Análise histométrica, imunoistoquímica, por microtomografia computadorizada e microscopia confocal"**, Processo FOA nº 00685-2015, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de março de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Julho de 2017.

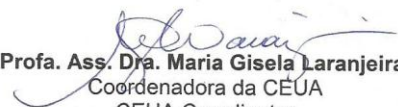
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Agosto de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the wound healing process in estrogen deficiency rats treated with denosumab or strontim ranelate. Histometric, immunohistochemistry, computed microtomography and confocal microscopy analysis"**, Protocol FOA nº 00685-2015, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 24, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 26, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 26, 2017.


Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br